

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.01.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年11月22日

出願番号
Application Number: 特願2003-431323

[ST. 10/C]: [JP2003-431323]

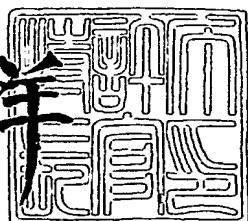
出願人
Applicant(s): 早出 広司
池袋 一典

2005年 2月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 TUAT031122
【提出日】 平成15年11月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都目黒区南1丁目13-16
 【氏名】 早出 広司
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷区代田3丁目27-29-309
 【氏名】 池袋 一典
【特許出願人】
 【識別番号】 596153357
 【氏名又は名称】 早出 広司
【特許出願人】
 【識別番号】 501414250
 【氏名又は名称】 池袋 一典
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項1】**

あるタンパク質に結合しその特性を変化させるアプタマーに、標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結した核酸プローブを用意し、その核酸プローブが標的配列と結合することによってアプタマーの構造に影響を及ぼし、アプタマーが本来タンパク質に与える効果の変動を観察することにより標的塩基配列を検出する方法。

【請求項2】

標的塩基配列が一塩基多型を含み、プローブが標的塩基配列における一塩基の置換に伴いそのリガンドであるタンパク質との親和性が変動し、タンパク質に与える効果が変化するものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】

あるタンパク質に結合しその特性を変化させるアプタマーに、標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結し、標的塩基配列とのハイブリダイゼーションによってそのリガンドであるタンパク質に与える効果が変動する標的塩基配列検出用プローブ。

【請求項4】

請求項1及び2においてアプタマーが標的塩基配列に結合することによりその構造がより安定化し、アプタマーがリガンドであるタンパク質に与える本来の効果の増強を観察することにより標的塩基配列を検出する方法。

【請求項5】

請求項3においてアプタマーが標的塩基配列に結合することによりその構造がより安定化し、アプタマーがリガンドであるタンパク質に与える本来の効果が増強される標的塩基配列検出用プローブ。

【請求項6】

請求項1及び2においてアプタマーが標的塩基配列に結合することによりその構造がより不安定化し、アプタマーがリガンドであるタンパク質に与える本来の効果の減少を観察することにより標的塩基配列を検出する方法。

【請求項7】

請求項3においてアプタマーが標的塩基配列に結合することによりその構造がより不安定化し、アプタマーがリガンドであるタンパク質に与える本来の効果が減少する標的塩基配列検出用プローブ。

【請求項8】

請求項1、2、4、6においてアプタマーのリガンドであるタンパク質が酵素であることを特徴とする標的塩基配列を検出する方法。

【請求項9】

請求項3、5、7においてアプタマーのリガンドであるタンパク質が酵素であることを特徴とする標的塩基配列検出用プローブ。

【請求項10】

請求項8において酵素に与える効果が酵素活性に与える効果であり、その活性を分光学的手法により観察することを特徴とする標的塩基配列を検出する方法。

【請求項11】

請求項8において酵素に与える効果が酵素活性に与える効果であり、その活性を電気化学的手法により観察することを特徴とする標的塩基配列を検出する方法。

【請求項12】

請求項3、5、7、9において標的塩基配列の相補的塩基配列の一部をアプタマーの5'端に、残りの標的塩基配列と相補的な塩基配列の部分を3'端に連結したプローブ。

【請求項13】

請求項10及び11において酵素がトロンビンであることを特徴とする標的塩基配列を検出する方法。

【請求項14】

請求項1、2、4、6、8、10、11、13に記載の標的塩基配列を検出する方法を含

む標的塩基配列検出用試薬。

【請求項15】

請求項3、5、7、9、12に記載のプローブからなる標的塩基配列検出用試薬。

【請求項16】

請求項1、2、4、6、8、10、11、13に記載の標的塩基配列を検出する方法を含む標的塩基配列検出用センサー。

【請求項17】

請求項1、2、4、6、8、10、11、13に記載の標的塩基配列を検出する方法に基づきサルモネラを検出する試薬。

【請求項18】

請求項1、2、4、6、8、10、11、13に記載の標的塩基配列を検出する方法に基づきサルモネラを検出するセンサー。

【書類名】明細書

【発明の名称】アプタマーを用いた標的塩基配列の検出法

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定のタンパク質に結合するアプタマーを含むプローブを用いて特定のタンパク質の特性を指標として、目的の塩基配列を有するDNAを検出する原理に関する。

【背景技術】

【0002】

目的の塩基配列を検出する場合、それと相補的な塩基配列を有するDNAを合成し、これをプローブとして標的とする核酸とのハイブリダイゼーションを検出するのが一般的である。このハイブリダイゼーションは、一般に蛍光物質や放射性同位体を結合させたプローブ、すなわち蛍光物質や放射性同位体で標識したプローブを用い、標的塩基配列を含むDNAとハイブリダイゼーションさせ、その結果生じるプローブの標識物質が発する信号すなわち蛍光強度や放射活性を測定することによって検出する。

これらの蛍光や放射活性を測定する方法は、現在nMレベルの標的DNAの検出が可能であり、かなり高感度の検出が可能になってきているが、今後標的DNAの検出は、発病機構解析や薬剤の作用機作解析、さらには極微量微生物、ウイルスの検出へ応用されると考えられ、さらに高感度な検出、すなわちpM、fM、aMレベルの解析が必要とされる。その為にはプローブから得られる信号を数千倍から数万倍に增幅する手段が必要となる。

また、蛍光を測定する場合は蛍光光度計や蛍光顕微鏡、放射活性を測定する場合はシンチレーションカウンターが必要であり、従来法による標的塩基配列の検出には高価な大型機器を必要とする。今後標的塩基配列の検出は、前述したように様々な分野での応用が期待されており、その為には特殊な分析機器を有する研究施設や大学、大病院だけでなく様々な場所で標的塩基配列の検出が可能になることが必要である。その為には、例えば酵素反応の生成物を測定できる電極などの簡単な計測機器を用いて迅速に標的塩基配列を検出する技術の開発が必要不可欠である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

解決しようとする問題点は、現在の標的塩基配列決定法が煩雑かつ感度が不十分であることであり、酵素等のタンパク質の特性を指標として、標的塩基配列を高感度に検出する測定法を開発し、簡便な標的塩基配列検出法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、特定のタンパク質に結合しその特性を変化させるアプタマーに、標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結した核酸プローブを用意し、その核酸プローブが標的配列と結合することによってアプタマーの構造に影響を及ぼし、アプタマーが本来タンパク質に与える効果の変動を観察することにより標的塩基配列を検出することにより、本発明を完成した。なおアプタマーとは特定のタンパク質に結合する核酸リガンドであり、1990年にGoldらによって初めてその概念が報告されている⁽¹⁾。通常このアプタマーは、Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment (SELEX)と呼ばれる方法で獲得される(Tuerk, C. and Gold L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science, 249, 505-510)。

【0005】

すなわち、本発明は、特定のタンパク質としてトロンビンを用い、トロンビンと結合する31-merのDNAアプタマー（トロンビンアプタマー）の5'、3'両端に標的塩

基配列と相補的な塩基配列を連結した合成DNAプローブを作製し、これと標的塩基配列を含むDNAとをハイブリダイゼーションさせることによってトロンビンアプタマーの構造に影響を与え、その結果としてトロンビンアプタマーが酵素反応に与える効果の変動を指標として2本鎖DNAの形成を検出することによって標的塩基配列を検出する原理を提供する。

特定のタンパク質としては、酵素でもレセプターでも蛍光タンパク質でもその特性の変化を容易に検出できるものなら何でもよい。その中でもその特性が最も容易かつ高感度に検出できるものとしては、化学反応を触媒する酵素が好ましい。原理的にはあらゆる酵素に対してそれに結合するアプタマーはSELEXにより獲得できるはずであり、本発明はどの酵素を用いてもそれに結合するアプタマーを用いれば標的塩基配列を検出することができる。本発明をもっとも容易に実現する為には酵素の中でもその活性を阻害するアプタマーが複数報告されているトロンビンが好ましい。

また、プローブとしては特定のタンパク質に結合するアプタマーに標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結し、標的塩基配列とハイブリダイゼーションすることにより、アプタマーが特定のタンパク質に与える影響が変化するものであれば、どのようなものでも良い。連結の仕方としてはアプタマーの5'に標的塩基配列の相補的塩基配列の一部を連結し、3'端に相補的塩基配列の残りの部分を連結しハイブリダイゼーションによってアプタマーの構造が安定化され、アプタマーがそのリガンドである特定のタンパク質に与える影響が増強されるものが好ましいが、相補的塩基配列の向きを反対にして、アプタマーの構造が破壊され、リガンドである特定のタンパク質に与える影響が減少するものでも良い(図1)。また、アプタマーの配列の中に標的塩基配列の相補的塩基配列の一部を含み、ハイブリダイゼーションによりアプタマーの構造が破壊され、リガンドである特定のタンパク質に与える影響が減少するものでも良い(図1)。すなわち特定のタンパク質を酵素とし、アプタマーとしてその酵素活性を阻害するものを用いた場合は、プローブが標的塩基配列とハイブリダイゼーションすることで、プローブ内のアプタマーの構造が安定化し、酵素活性をより強く阻害するものでも良いし、逆にアプタマーの構造が破壊され、酵素活性の阻害が解消され、結果として酵素反応が促進されるものでも良い。

その酵素反応の検出法としては、従来からよく使われている比色法など様々な方法が利用できるが、好ましくは測定系を単純化する事が可能で、微小化、集積化、量産化が可能な電気化学的測定法である。

【0006】

本発明はまた、本発明の原理に基づくDNA、RNA、SNP(Single Nucleotide Polymorphism:一塩基多型)検出用試薬ならびにDNA、RNA、SNPセンサーまたはDNA、RNA、SNPチップ及びマイクロアレイを提供する。SNPについては標的配列の一塩基変異を検出する事が必要であるが、例えば一塩基の違いにより標的塩基配列とプローブDNAがハイブリダイゼーションしない測定条件を工夫したりすることにより本原理に基づいた高感度検出は可能である。

【発明の効果】

【0007】

酵素の活性を指標とすることにより、標的塩基配列とプローブの1:1のハイブリダイゼーションから得られる信号を数千倍から数万倍に増幅することが可能になる。また本発明では標的塩基配列を含むDNAとプローブとのハイブリダイゼーションを両者を混合して直接観察することができ、従来の方法で必要であった、標的塩基配列を含むDNAとプローブとの分離の走査を必要としない。従って極めて高感度かつ簡単な標的塩基配列の検出が実現出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は、特定のタンパク質に結合するアプタマーを含むプローブを用いて特定のタンパク質の特性を指標として、目的の塩基配列を有するDNAを検出することを特徴とする。例として特定のタンパク質としてトロンビンを用い、トロンビンと結合してその酵素活

性を阻害する31-merのDNAアプタマー（トロンビンアプタマー）の5'、3'両端に標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結した合成DNAプローブを作製し、これと標的塩基配列を含むDNAとをハイブリダイゼーションさせることによってトロンビンアプタマーの構造に影響を与え、その結果としてトロンビンアプタマーによる酵素反応の阻害が増強され、酵素反応が減少することを観察することによって標的塩基配列を検出することができる。

【0009】

特定のタンパク質としては、酵素でもレセプターでも蛍光タンパク質でもその特性の変化を容易に検出できるものなら何でもよいが、その中でも好ましくはその特性が最も容易かつ高感度に検出できるものとしては酵素がよい。本発明をもっとも容易に実現する為には酵素の中でもその活性を阻害するアプタアプタマーが複数報告されているトロンビンが好ましい。当業者は、あらゆる酵素に対してそれに結合するアプタマーをSELEXにより獲得でき、どの酵素を用いてもそれに結合し、その活性に影響を与えるアプタマーを用いれば、本発明の教示にしたがって標的塩基配列を検出することができる。

【0010】

プローブとしては、アプタマーの5'に標的塩基配列の相補的塩基配列の一部を連結し、3'端に相補的塩基配列の残りの部分を連結しハイブリダイゼーションによってアプタマーの構造が安定化され、アプタマーがそのリガンドである特定のタンパク質に与える影響が増強されるものが好ましい。またはその相補的塩基配列の向きを反対にして、アプタマーの構造が破壊され、リガンドである特定のタンパク質に与える影響が減少するものでも良い。さらにアプタマーの配列の中に標的塩基配列の相補的塩基配列の一部を含み、ハイブリダイゼーションによりアプタマーの構造が破壊され、リガンドである特定のタンパク質に与える影響が減少するものでも良い。すなわち特定のタンパク質に結合するアプタマーに標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結し、標的塩基配列とハイブリダイゼーションすることにより、アプタマーが特定のタンパク質に与える影響が変化するものであれば、どのようなものでも良い。すなわち特定のタンパク質を酵素とし、アプタマーとしてその酵素活性を阻害するものを用いた場合は、プローブが標的塩基配列とハイブリダイゼーションすることで、プローブ内のアプタマーの構造が安定化し、酵素活性をより強く阻害するものでも良いし、逆にアプタマーの構造が破壊され、酵素活性の阻害が解消され、結果として酵素反応が促進されるものでも良い。これらのプローブ及びそれを含む標的塩基配列検出用試薬、センサーシステムも本発明の範囲内である。

【0011】

標的塩基配列を検出する際に、特定のタンパク質として、レセプターを用いた場合はその結果として放出される化学物質を分光学的方法で検出することが考えられ、特定のタンパク質が蛍光タンパク質である場合はその蛍光特性を観察すればよい。また特定のタンパク質が酵素である場合は、その反応の検出には従来からよく使われている比色法、蛍光光度測定法など様々な方法が利用できるが、好ましくは測定系を単純化する事が可能で、微小化、集積化、量産化が可能な電気化学的測定法である。

【0012】

プローブの製造方法

プローブは図1に示したように、特定のタンパク質に結合しその特性に影響を与えるアプタマーを基本骨格とし、その両端または一部に標的塩基配列と相補的塩基配列を挿入したプローブを設計し、DNA合成機で固相合成する。

【0013】

酵素活性の測定方法

本発明は、特定のタンパク質を酵素とした場合は酵素活性を測定することにより、標的塩基配列を検出する。酵素としてトロンビンを用いる場合、基質としてN-Benzoyl-phe-Val-Arg-p-nitroanilideを用い、遊離したp-nitroanilineの吸光度(410nm)を測定することによってthrombinの活性を測定する。あるいは、血漿に終濃度が一定になるようにフィブリノーゲンとト

ロンビンを加えトロンビンによるフィブリノーゲンの切断によって開始される血液凝固を測定することによって、*thrombin*の活性を測定することもできる。血液凝固の測定は様々な方法があり、分光学的方法による屈折率の変化の測定、血漿に金属球を添加し血液凝固に伴うその運動の停止を観察する方法、水晶振動子、表面プラズモン共鳴などによる測定も可能である。

【0014】

標的塩基配列検出用試薬

本発明はまた、本発明の原理に従う標的塩基配列検出用試薬を含む。典型的には、試薬は、本発明のプローブ、そのプローブが結合する酵素、その基質、アッセイに必要な緩衝液、キャリプレーションカーブ作製のための標的塩基配列を含むDNAの標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明にプローブは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。

【0015】

DNAセンサー、DNAチップ

本発明はまた、本発明の原理に従うプローブを用いるDNAセンサー、DNAチップも含む。例えばプローブのリガンドとなる酵素の活性測定に電極を利用できるが、電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上にプローブDNAを固定化する。固定化方法としては、アビジン-ビオチンの結合を利用する方法、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーで包括固定する方法などがあり、その場合フェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。典型的には、アビジン-ビオチンの結合を用いてプローブDNAをカーボン電極上に固定化した後、標的塩基配列を含むDNAとハイブリダイゼーションさせ、酵素を添加して酵素反応生成物を電気化学測定することによりハイブリダイゼーション形成を検出する。

本発明はまた、本発明の原理に基づくSNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) 検出キットならびにSNPセンサーまたはSNPチップ及びマイクロアレイを提供する。SNPは標的配列の一塩基変異を検出する事が必要であるが、例えば一塩基の違いにより標的DNAとプローブDNAがハイブリダイゼーションしない測定条件を工夫したりすることにより上記の方法で高感度検出は可能である。一塩基変異があるとハイブリダイゼーションしない条件としては温度や尿素やホルムアミドなどの変成剤を共存させることが考えられる。

【0016】

標的塩基配列の検出は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、一定温度に維持する。作用電極としてプローブDNAを固定化した電極（例えばカーボン電極）を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。標的塩基配列を含むDNAを添加してプローブDNAとハイブリダイゼーションさせた後、プローブのリガンドである酵素を添加し、一定時間インキュベートした後、酵素の基質を添加し電極に一定の電圧を印加して、酵素反応によって精製される電極に反応する生成物の反応による電流の増加を測定する。標準濃度のDNA溶液により作製したキャリプレーションカーブに従い、試料中のDNA濃度を計算することができる。

【0017】

以下、サルモネラ菌の侵入性因子関連遺伝子 (*invA*) 遺伝子の検出を例として実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0018】

プローブDNAの作製

トロンビンの酵素活性を阻害するDNA aptamerの5'端、3'端それぞれに18merのサルモネラが有する*invA*遺伝子の一部と相補的塩基配列を持つプローブ

DNA aを合成した。その配列とトロンビンの酵素活性を阻害するDNA aptamer（トロンビンアプタマー）の配列を以下に示す。この際両端に付加した配列のTm値が同じになるように設計した（Tm値は58度）。プローブDNA、36merの標的塩基配列を有するDNA（invADNA）、対照として用いた36merDNA（コントロールDNA）の配列以下に示す。

プローブDNA：

ACTCATCTGTTACCGGGcactggtaggttggtgtggttgg
gggccagtgCTTCAAATCGGCATCAA

トロンビンアプタマー：cactggtaggttggtgtggttggggccag
tg

invADNA：CCCGGTAAACAGATGAGTATTGATGCCGATT
GAAG

コントロールDNA：ATTGTACTTGGACTGTGCATTAGCATTGTTA
CAGTCA

【実施例2】

【0019】

トロンビンの活性を測定することによる標的塩基配列の検出

トロンビンは50mM Tris-HCl、100mM NaCl、pH8.0に調製したbufferに溶解し適度の濃度に希釈して活性の測定に用いた。トロンビンの基質として終濃度200μMのN-Benzoyl-phenyl-Val-Arg-p-nitroanilineを用い、遊離したp-nitroanilineの吸光度(410nm)を測定することによってthrombinの活性を測定した。終濃度1μMの36プローブDNAに0.1~1μMの36merのinvA配列を有するDNAを加え95℃で3分インキュベートした後に30分かけて室温まで冷却し、invADNA存在下でのプローブDNAの阻害能を測定した。またコントロールとして任意に決定した36merのコントロールDNAをinvADNAの代わりに加え同様にしてthrombinの活性を測定した。また終濃度1μMのプローブDNA、終濃度1μMのinvADNAに0.1、1μMのinvADNAの相補鎖を加え、同様に熱処理しプローブDNAのトロンビン酵素活性の阻害能を測定した。

【0020】

その結果を図2に示す。0.1μM以上の濃度のinvA配列を加えることによりaptamerによるthrombinの酵素活性の阻害が解消された。またinvA配列の相補鎖を加えることによりinvA配列によるaptamerによるthrombinの酵素活性の阻害解消効果が減少した（図3）。これらの結果よりプローブDNAにinvA配列がアニーリングすることによりaptamerによるthrombinの酵素活性の阻害が解消されることが示唆された。

【実施例3】

【0021】

プローブDNAとトロンビンアプタマーに対して1, 0.5, 0.1倍量の36mer invADNAを混ぜ上記と同様に熱処理後、11%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動しじのような複合体を形成しているかを確認した。

【0022】

電気泳動の結果、プローブDNAに36mer invADNAを加えることによりプローブDNAのバンドが薄くなり、かつ複数のバンドが確認された。この結果よりプローブDNAが36mer invADNAとハイブリダイセーションし、いくつかの複合体を形成していることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0023】

上述のように目的の塩基配列を持つDNAを特定のタンパク質の特性を指標にして検出する事ができるようになった。特に酵素活性を指標とすると、試料中の標的塩基配列を含

むDNAが極少量しか存在しなくともその信号を数千倍、数万倍に増幅することが可能であり、発病機構解析や薬剤の作用機作解析、さらには極微量微生物、ウィルスの検出へ応用できると考えられる。

さらにDNAチップやマイクロアレイのような一度に多数の標的DNAを解析する技術においても、酵素活性を指標にしてDNAが検出できれば、例えばその検出は電極で行うことが可能であり、その場合高集積度のチップを簡単に製作・解析することが可能になる。今後標的塩基配列の検出は、様々な分野での応用が期待されており、その為には特殊な分析機器を有する研究施設や大学、大病院だけでなく様々な場所で標的DNAの検出が可能になることが必要不可欠であり、本発明はその為の基盤技術を提供する。

【図面の簡単な説明】

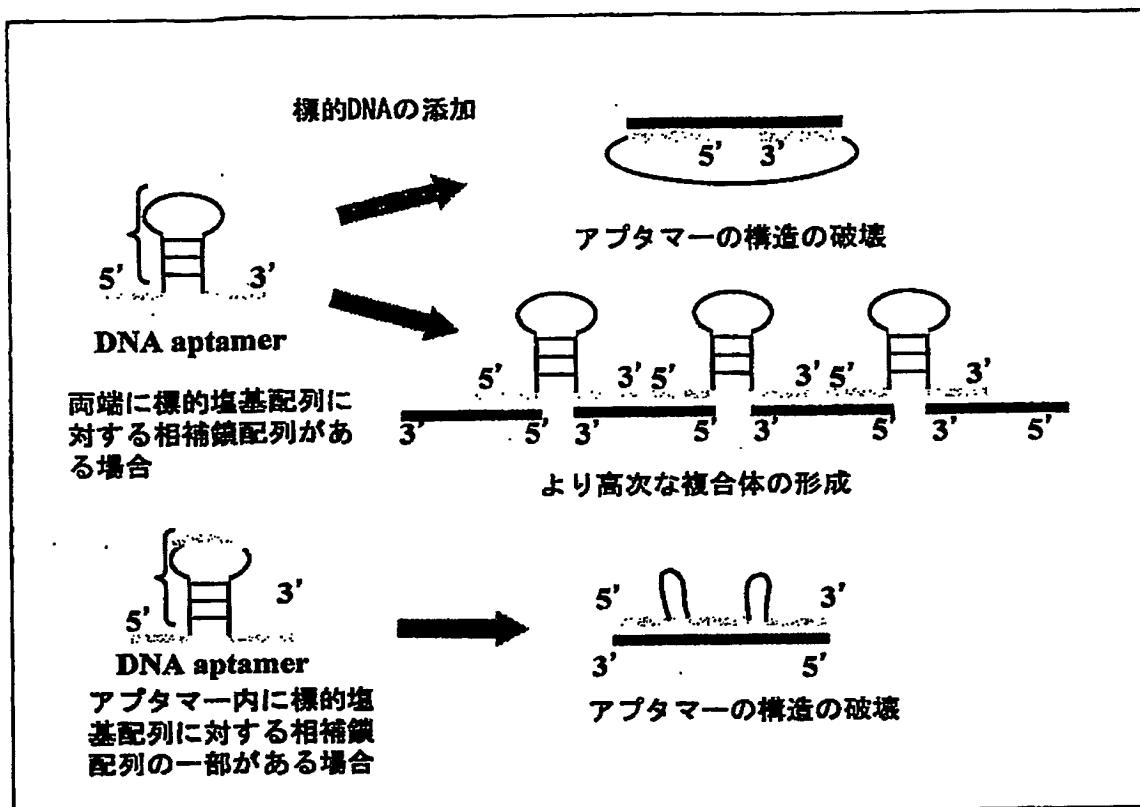
【0024】

【図1】プローブDNAと標的DNAの複合体の模式図

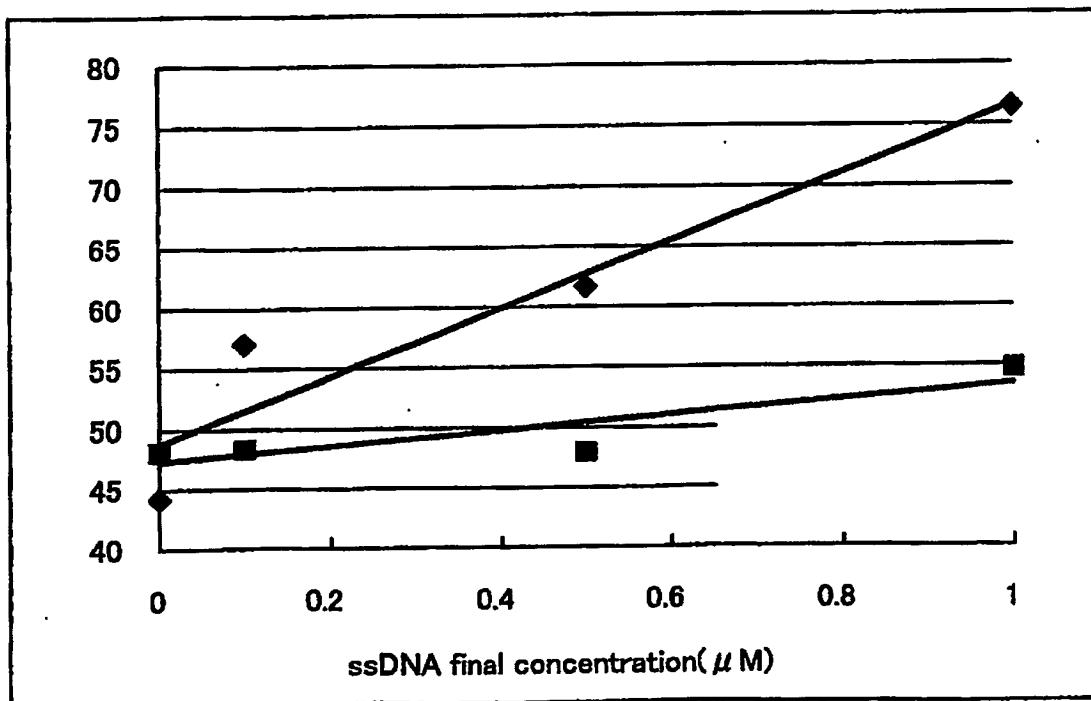
【図2】invADNA存在下におけるthrombinの残存活性

【図3】invADNAの相補鎖存在下におけるthrombinの残存活性

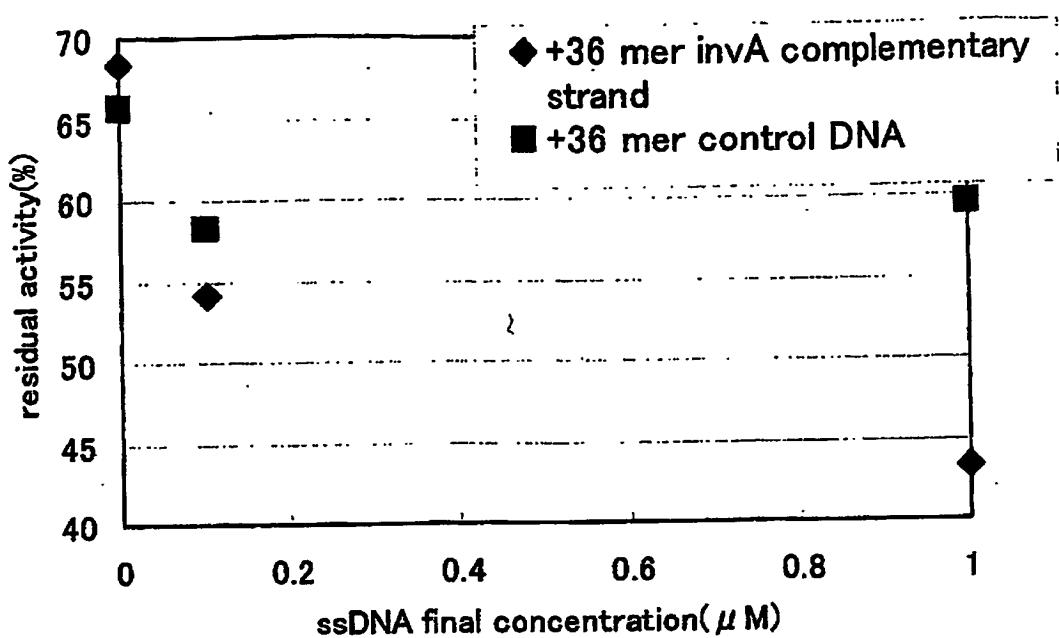
【書類名】 図面
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、酵素等のタンパク質の特性を指標として、標的塩基配列を高感度に検出する測定法を開発し、簡便な標的塩基配列検出法を提供すること。

【解決手段】 本発明者は、特定のタンパク質に結合しその特性を変化させるアプタマーに、標的塩基配列と相補的な塩基配列を連結した核酸プローブを用意し、その核酸プローブが標的配列と結合することによってアプタマーの構造に影響を及ぼし、アプタマーが本来タンパク質に与える効果の変動を観察することにより標的塩基配列を検出することにより、本発明を完成した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-431323
受付番号	20302210328
書類名	特許願
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成16年 4月22日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	596153357
【住所又は居所】	東京都目黒区南1-13-16
【氏名又は名称】	早出 広司
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	501414250
【住所又は居所】	東京都世田谷区代田3丁目27-29-309
【氏名又は名称】	池袋 一典

特願 2003-431323

出願人履歴情報

識別番号 [596153357]

1. 変更年月日 1996年10月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都目黒区南1-13-16

氏名 早出 広司

特願 2003-431323

出願人履歴情報

識別番号 [501414250]

1. 変更年月日 2001年 9月18日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都世田谷区代田3丁目27-29-309
氏名 池袋 一典

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017665

International filing date: 22 November 2004 (22.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-431323
Filing date: 22 November 2003 (22.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 March 2005 (10.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in
compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse